

1 大豆及び大豆油かす中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発及び共同試験

齊木 雅一^{*1}, 顯谷 久典^{*2}, 宮野谷 杏^{*2}

Development and Collaborative Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino-Acid-Based Pesticides in Soybeans and Soybean Meal by LC-MS/MS

SAIKI Masakazu^{*1}, ARAYA Hisanori^{*2} and MIYANOYA Kyo^{*2}

(*¹ Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now Hokkaido District Agriculture Office, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan)

^{*2} Sapporo Regional Center, FAMIC)

We have developed a quantitative determination method of the concentration of phosphorus-containing amino-acid-based pesticides in soybeans and soybean meal using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), and conducted a collaborative study.

Phosphorus-containing amino-acid-based pesticides in soybeans and soybean meal were extracted with water and the extract was centrifuged. The supernatant was diluted with acetone and centrifuged. The supernatant was then purified with two types of SPE columns (Oasis HLB and Oasis Plus MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having derivatized these compounds with trimethyl orthoacetate, the sample solution was purified with two types of SPE columns (Sep-Pak Plus NH2 and Silica, Waters Co.), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of phosphorus-containing amino acid-based pesticides. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 0.01 v/v % formic acid solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on soybean, kinako (roasted soybean flour) and soybean meal. Glyphosate (GLYP) and *N*-acetylgllyphosate were intentionally added at the levels of 0.04 and 20 mg/kg, and glufosinate (GLUF), *N*-acetylglufosinate and 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) were intentionally added at the levels of 0.05 and 2 mg/kg respectively. The resulting mean recoveries ranged from 82.3 % to 115 % for GLYP, 84.5 % to 110 % for *N*-acetylgllyphosate, 80.9 % to 111 % for GLUF, 86.0 % to 117 % for *N*-acetylglufosinate, and 79.1 % to 113 % for MPPA respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 18 % for GLYP, less than 15 % for *N*-acetylgllyphosate, less than 12 % for GLUF, less than 18 % for *N*-acetylglufosinate, and less than 11 % for MPPA.

A collaborative study was conducted by eight laboratories using two kinds of soybeans, kinako and three kinds of soybean meal, all of which were added with GLYP, GLUF and MPPA according to the following specifications: the first soybean was spiked with 0.2 mg/kg of GLYP, and 0.1 mg/kg of GLUF and MPPA, the second soybean was spiked with 20 mg/kg of GLYP, and 2 mg/kg of GLUF and MPPA; kinako was spiked with 5 mg/kg of GLYP, and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA; the first soybean meal was spiked with 1 mg/kg of GLYP, and 0.2 mg/kg of GLUF and MPPA, while the

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター, 現 農林水産省北海道農政事務所

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

second soybean meal was spiked with 12 mg/kg of GLYP, and 1.5 mg/kg of GLUF and MPPA, and finally the third soybean meal was spiked with 24 mg/kg of GLYP, and 2.5 mg/kg of GLUF and MPPA. The resulting mean recoveries ranged from 84.9 % to 98.3 % for GLYP, 94.3 % to 105 % for GLUF and 102 % to 117 % for MPPA. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 13 % and less than 17 % for GLYP, less than 13 % and less than 23 % for GLUF, less than 20 % and less than 26 % for MPPA respectively. The HorRat was less than 1.6 for GLYP, less than 1.3 for GLUF, and less than 1.6 for MPPA.

This method was thus validated as useful for inspections of phosphorus-containing amino acid-based pesticides in soybeans and soybean meal.

Key words: phosphorus-containing amino-acid-based pesticide; glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico) propanoic acid; *N*-acetylglyphosate; *N*-acetylglufosinate; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); soybean; soybean meal; collaborative study

キーワード: 含リンアミノ酸系農薬; グリホサート; グルホシネート; 3-メチルホスフィニコプロピオン酸; *N*-アセチルグリホサート; *N*-アセチルグルホシネート; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 大豆; 大豆油かす; 共同試験

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という。）は Monsanto Company（米国）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す。GLYP 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている¹⁾。

グルホシネート（以下「GLUF」という。）は Hoechst AG（ドイツ）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す。また、GLUF は、非遺伝子組換え植物中では 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という。）、GLUF 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグルホシネートに代謝されることが知られている²⁾。

現在、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律³⁾に基づき農林水産大臣が安全性を確認した GLYP 耐性遺伝子及び GLUF 耐性遺伝子を持つとうもろこしや大豆が飼料用として流通している。

GLYP の国内における飼料中の残留基準値⁴⁾は、大麦、えん麦及びマイロで 20 mg/kg、小麦で 5 mg/kg、とうもろこしで 1 mg/kg、ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg と定められている。また、農林水産省局長通知による飼料の有害物質の管理基準値⁵⁾は、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 0.2 mg/kg と定められている。

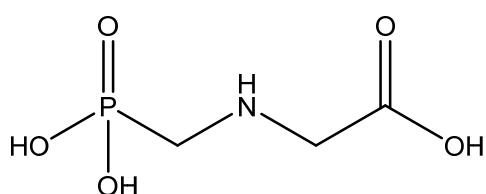
GLUF の飼料中の残留基準値⁴⁾は、穀類においては GLUF、MPPA を GLUF に換算したものと及び *N*-アセチルグルホシネートを GLUF に換算したものの総和として定められており、大麦で 0.5 mg/kg、小麦で 0.2 mg/kg 及びとうもろこしで 0.1 mg/kg である。また、飼料の有害物質の管理基準値⁵⁾は、稲わらで 0.5 mg/kg 及び WCRS で 0.1 mg/kg と定められている。

これら含リンアミノ酸系農薬の飼料中の分析法としては、飼料分析基準⁶⁾に記載された含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による同時分析法⁷⁾⁻¹⁰⁾（以下「収載法」という。）があるが、大豆及び大豆油かすは適用範囲に含まれ

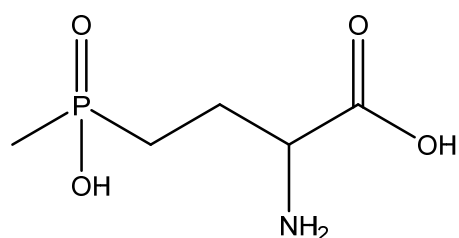
ていない。

平成 30 年度に筆者らは、収載法の適用範囲を大豆及び大豆油かすに拡大するための妥当性を検証したところ⁷⁾、大豆については抽出液が白濁しており、カラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかった。また、大豆油かすについては、マトリックス効果によるイオン化促進のため、回収率が飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度の目標値を満たさなかった。今回、収載法を改良するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

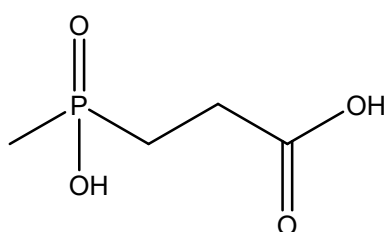
なお、飼料分析基準では、単に GLUF と記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定されていることから、GLUF と記載した場合には同様の扱いとした。また、*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートは、それぞれ GLYP 及び GLUF のアセチル体であり、分析操作の過程で親成分と同一の誘導体になることから、*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについては共同試験を実施せず、GLYP、GLUF 及び MPPA について実施することとした。



Glyphosate (GLYP)

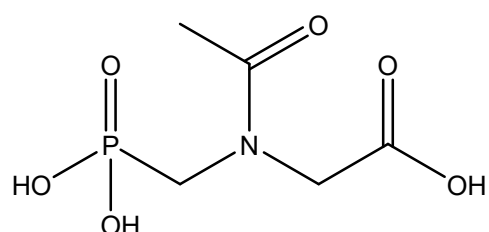
N-(phosphonomethyl)glycineC₃H₈NO₅P MW: 169.1 CAS No.: 1071-83-6

Glufosinate (GLUF)

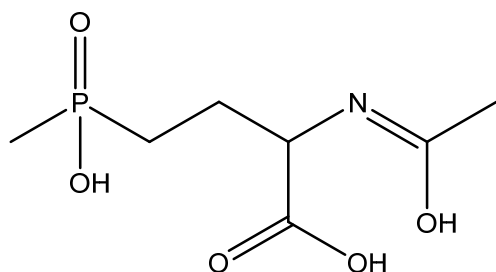
(2RS)-2-amino-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acidC₅H₁₂NO₄P MW: 181.1 CAS No.: 51276-47-2

3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA)

3-(methylphosphinico)propionic acid

C₄H₉O₄P MW: 152.1 CAS No.: 15090-23-0*N*-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

C₅H₁₀NO₆P MW: 211.1 CAS No.: 129660-96-4*N*-acetylglufosinate*(2RS)*-2-acetamido-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]

butyric acid

C₇H₁₄NO₅P MW: 223.2 CAS No.: 73634-73-8Fig. 1 Chemical structures of GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

2 実験方法

2.1 分析法開発

2.1.1 試料

大豆及び大豆油かすは、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。きな粉はそのまま分析用試料として使用した。

2.1.2 試薬

- 1) メタノール, アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製 (純度 98.0 %以上) を用いた。酢酸は試薬特級を用いた。アセトニトリルは LC-MS 用 (関東化学製) を用いた。ギ酸は LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Direct8 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製) を用いた。
- 2) GLYP 標準原液
グリホサート標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.3 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP として 1 mg を含有)。
- 3) GLUF 標準原液
グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr.Ehrenstorfer GmbH 製, 純度 99.2 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて GLUF 標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLUF として 1 mg を含有)。
- 4) MPPA 標準原液
MPPA 標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.9 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 標準原液を調製した (この液 1 mL は, MPPA として 1 mg を含有)。
- 5) *N*-アセチルグリホサート標準原液
N-アセチルグリホサート標準品 (Tronto Research Chemicals 製, 純度 97 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグリホサート標準原液を調製した (この液 1 mL は, *N*-アセチルグリホサートとして 1 mg を含有)。
- 6) *N*-アセチルグルホシネート標準原液
N-アセチルグルホシネートナトリウム標準品 (Tronto Research Chemicals 製, 純度 95 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグルホシネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, *N*-アセチルグルホシネートとして 0.836 mg を含有)。
- 7) 検量線作成用混合標準原液
GLYP 標準原液, GLUF 標準原液及び MPPA 標準原液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れて混合し, 更に標線まで水を加えて検量線作成用混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有)。
- 8) 0.01 v/v%ギ酸溶液
ギ酸 1 mL に水を加えて 1 L とし, 更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした。

2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 振とう機: レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム: Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 500 mg) Waters 製にリザーバー (容量 6 mL) を連結したもの

- 4) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis Plus MCX カートリッジ (充てん剤量 225 mg) Waters 製
- 5) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus NH2 カートリッジ (充てん剤量 360 mg) Waters 製にリザーバー (容量 10 mL) を連結したもの
- 6) シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus Silica カートリッジ (充てん剤量 690 mg) Waters 製
- 7) LC-MS/MS :
LC 部 : ACQUITY UPLC Waters 製
MS 部 : Quattro Premier XE Waters 製

2.1.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトンで正確に 2.5 倍に希釈し、15 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。)。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 1 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、溶出させた。さらに、水 18 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。溶出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化

試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。)。試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に、酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、GLYP 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加え、MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。溶出液を 50 °C 以下の

水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v%ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) 標準液の誘導体化

検量線作成用農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷した。この液を、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v%ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含む標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% formic acid aqueous solution – acetonitrile (93:7) (hold for 12 min) → 3 min → (5:95) (hold for 10 min) → 6 min → (93:7) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
GLYP derivative	254	102	—	22	17
		—	152	22	17
GLUF derivative	252	210	—	26	14
		—	150	26	14
MPPA derivative	181	149	—	21	14
		—	93	21	14

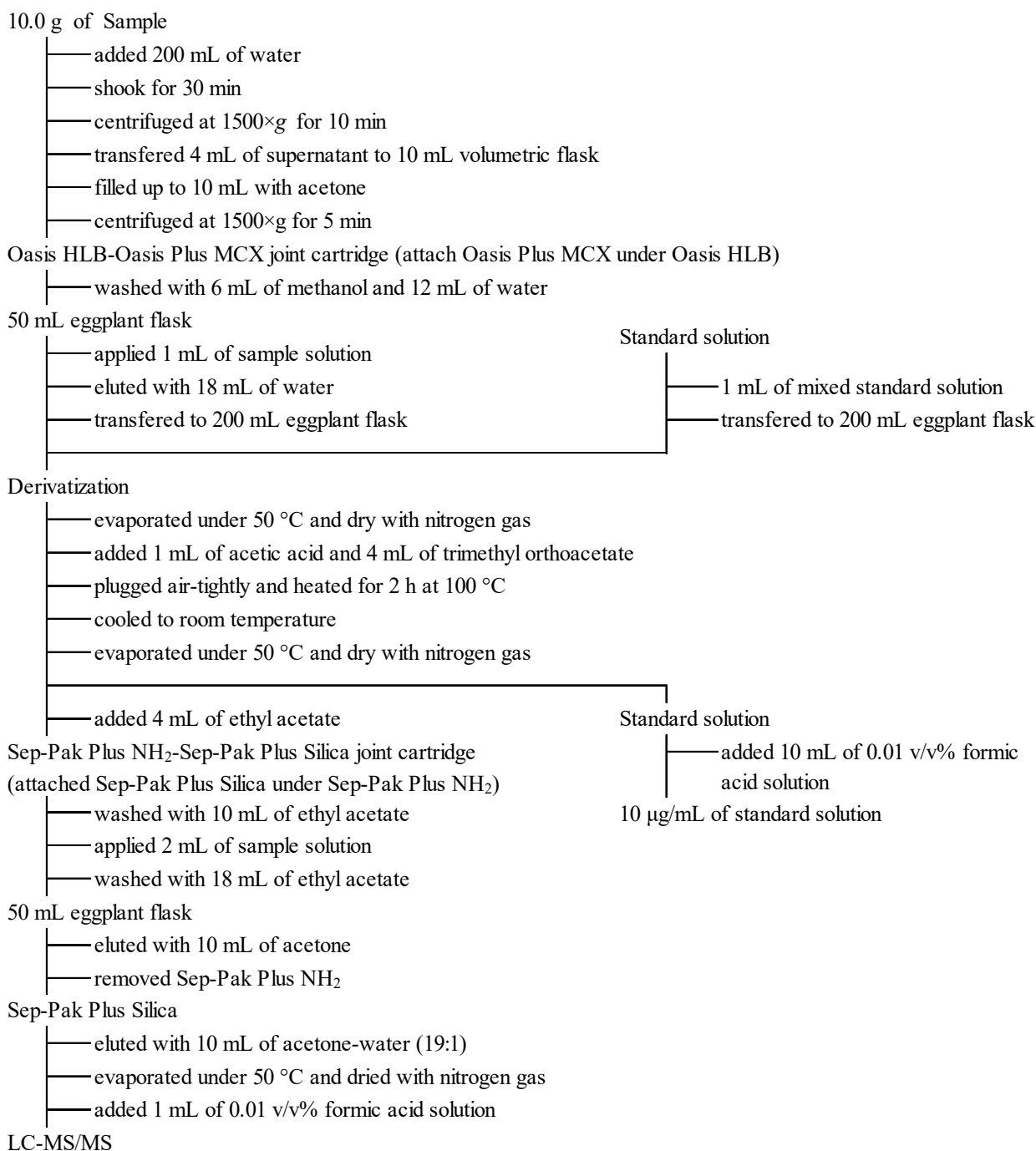
7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の

GLYP 量 (*N*-アセチルグリホサート由来を含む) , GLUF 量 (*N*-アセチルグルホシネート由来を含む) 及び MPPA 量を算出した.

また, 3)の誘導体化により GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは GLYP 誘導体に, GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートは GLUF 誘導体にそれぞれなることから, *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は, 検量線から求めた GLYP 又は GLUF の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) に換算し, 添加した *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) で除してその割合を求めることにより行った.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate in soybean and soybean meal

2.1.5 添加回収試験

2.1.2 の 2) ~6) の GLYP 標準原液, GLUF 標準原液, MPPA 標準原液, *N*-アセチルグリホサート標準原液及び *N*-アセチルグルホシネート標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

大豆, きな粉及び大豆油かすに GLYP として 0.04 及び 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 0.4 及び 200 ng/mL 相当量), GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 0.5 及び 20 ng/mL 相当量) 及び MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 MPPA として 0.5 及び 20 ng/mL 相当量), *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量 (同 GLYP と

して 0.32 及び 16 ng/mL 相当量) 及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 0.37 及び 1.5 ng/mL 相当量) になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.2 共同試験

2.2.1 試料

GLYP, GLUF 及び MPPA を含有しないことを確認した 2 種類の大豆及び 3 種類の大豆油かすをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。これらの試料及び GLYP, GLUF 及び MPPA が含有しないことを確認した 1 種類のきな粉について約 12 g ずつ小分けしたものの (試料名は非明示) 各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 試薬

1) アセトニトリルは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた。アセトン、メタノール及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用又はこれと同等以上のものを用いた。酢酸及びギ酸は特級又はこれと同等以上のものを用いた。オルト酢酸トリメチルは純度 98 % 以上のものを用いた。水は超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) 又は液体クロマトグラフ用を用いた。

2) GLYP 標準原液

GLYP 標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 98.9 %) 200 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLYP として 1 mg を含有)。

3) GLUF 標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr. Ehrenstorfer GmbH 製, 純度 99.04 %) 100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて GLUF 標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLUF として 1 mg を含有)。

4) MPPA 標準原液

MPPA 標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 99.7 %) 100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 標準原液を調製した (この液 1 mL は、MPPA として 1 mg を含有)。

5) 検量線作成用標準原液

2), 3) 及び 4) で調製した GLYP, GLUF 及び MPPA 各標準原液各 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線まで水を加えて、検量線作成用標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有)。

6) GLYP 標準液

2) で調製した GLYP 標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、GLYP 標準液を調製した (この液 1 mL は、GLYP として 100 µg を含有)。

7) 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液

3) 及び 4) で調製した GLUF 及び MPPA 各標準原液各 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液を調製した (この液 1 mL は、GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有)。

8) 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液

7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液を調製した（この液 1 mL は、GLUF 及び MPPA として各 10 µg を含有）。

9) 大豆 1 添加用標準液

6)で調製した GLYP 標準液 2 mL 及び 8)で調製した 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 2 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1 µg を含有する大豆 1 添加用標準液を調製した。

10) 大豆 2 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液各 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 200 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 20 µg を含有する大豆 2 添加用標準液を調製した。

11) きな粉添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液各 5 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 50 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 µg を含有するきな粉添加用標準液を調製した。

12) 大豆油かす 1 添加用標準液

6)で調製した GLYP 標準液 10 mL 及び 8)で調製した 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 10 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 µg を含有する大豆油かす 1 添加用標準液を調製した。

13) 大豆油かす 2 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液 15 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えた。この液 40 mL 及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 15 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 120 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 µg を含有する大豆油かす 2 添加用標準液を調製した。

14) 大豆油かす 3 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液 30 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えた。この液 40 mL 及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 25 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 240 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 25 µg を含有する大豆油かす 3 添加用標準液を調製した。

5)を 1 本及び 9)~14)を各 2 本、濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。なお、1)の試薬については各試験室において準備した。

2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。大豆 1 に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、大豆 2 に GLYP として 20 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、きな粉に GLYP として 5 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対してきな粉添加用標準液 1 mL 添加）を、大豆油かす 1 に GLYP として 1 mg/kg 相当量、GLUF 及

び MPPA としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 1 添加用標準液 1 mL 添加）を，大豆油かす 2 に GLYP として 12 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 2 添加用標準液 1 mL 添加）を，大豆油かす 3 に GLYP として 24 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 3 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の前日に添加して調製した。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

分析値は，分析試料中濃度（mg/kg）で表し，4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させた。

2.2.6 分析実施期間

令和 2 年 12 月 1 日から令和 2 年 12 月 28 日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{11), 12)}を参考に，平均回収率，繰返し精度（ RSD_f ）及び室間再現精度（ RSD_R ）を算出し，得られた RSD_R から，修正 Horwitz 式¹³⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

ジューエルサイエンス株式会社，一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター及び同神戸センター（計 8 試験室）

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 大豆抽出液の白濁除去の検討

平成 30 年度の検討において，収載法の大豆への適用を確認したところ，抽出液が白濁し，カラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかったことから，高橋らの方法¹⁴⁾を参考に，抽出液にアセトンを加え，遠心分離することで白濁を除去する方法を検討した。

その結果，0.4~0.8 倍量のアセトンを加えた抽出液は白濁が残ったが，1~1.5 倍量のアセトンを加えた抽出液は白濁がなくなり，カラム処理が可能であった。高橋らの方法では 0.8 倍量のアセトンを加えた抽出液で白濁が除去されているが，収載法では抽出液に 1.5 倍量の水を加えていることから，希釈倍率が同じとなるよう，抽出液に 1.5 倍量のアセトンを加える（2.5 倍希釈）方法が適当であると考えられた。

この方法の目的化合物への影響を確認するため，大豆の抽出液の白濁除去前に各化合物標準液を添加したものと，白濁除去後に各化合物標準液を添加したものの回収率を比較した。その結果，Table 3 のとおり，白濁除去操作を追加しても回収率に問題は認められなかった。

Table 3 Spiked before/after removal of cloudiness

Targets	Spiked level (mg/kg)	Concentration of sample solution (ng/mL)	spike before removal of cloudiness	spike after removal of cloudiness
			recovery ^{a)} (%)	recovery ^{a)} (%)
GLYP	20	200	99.2	111
GLUF	2	20	117	121
MPPA	2	20	112	105
<i>N</i> -acetylglyphosate	20	160	106	114
<i>N</i> -acetylglufosinate	2	15	119	120

a) $n = 1$

3.1.2 大豆の抽出方法の大豆油かすへの適用の検討

平成 30 年度の検討において、大豆油かすについては、マトリックス効果によるイオン化促進のため、回収率が妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。大豆油かすの抽出液の上澄みには濁りはないがアセトンを加えることにより白濁するため、抽出操作による夾雑物の除去として、大豆の抽出方法が大豆油かすに適用可能かを検討した。添加回収試験を実施した結果、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしたことから、大豆油かすにも大豆の抽出方法を適用することが適当と判断した。

3.1.3 妨害物質の検討

大豆 2 検体、きな粉 1 検体及び大豆油かす 3 検体を試料として、2.1.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

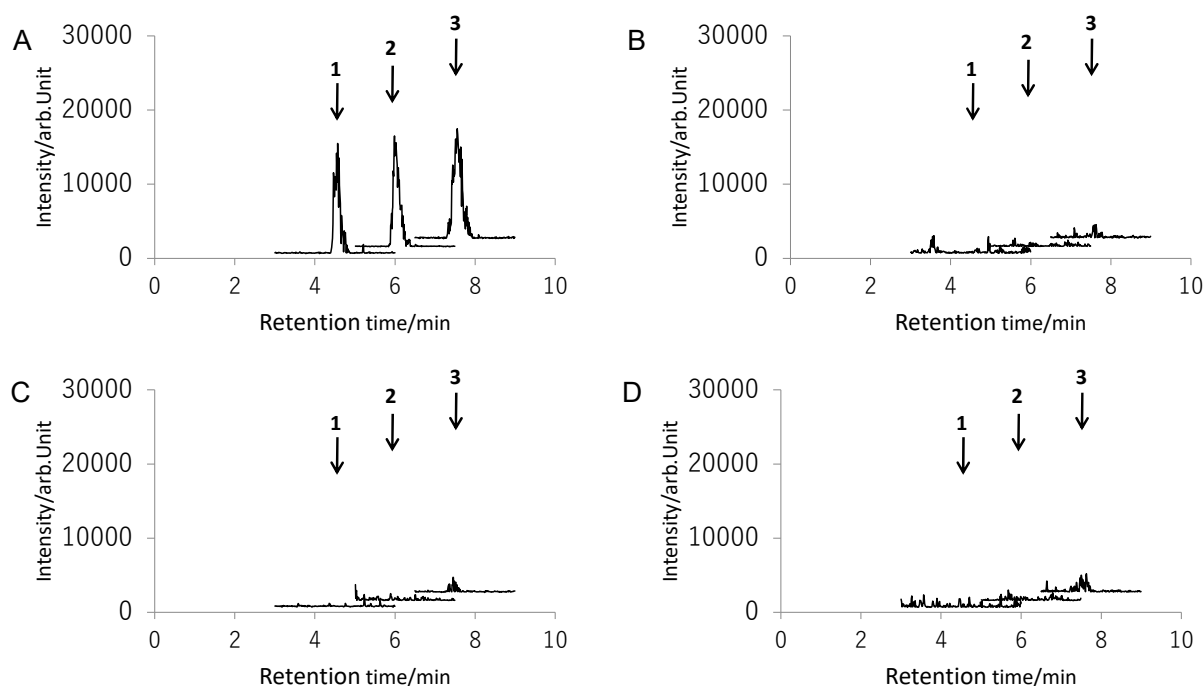


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL each)

B~D: Blank sample solution (B: soybean, C: kinako and D: soybean meal)

3.1.4 マトリックス効果の確認

2.1.4 の 1)及び 4)により調製した大豆及び大豆油かすのブランク試料溶液に GLYP 誘導体を GLYP として 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 200 ng/mL 相当量), GLUF 誘導体を GLUF として 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 20 ng/mL 相当量), MPPA 誘導体を MPPA として 2 mg/kg 相当量 (同 MPPA として 20 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液について, 2.1.4 の 5)に従って調製した同濃度の各化合物標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 4 のとおりであり, 各化合物は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

Table 4 Matrix effect study

Targets	Concentration of targets		Matrix effect ^{b)} (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	Soybean	Soybean meal
GLYP derivative	200	20	101	109
GLUF derivative	20	2	111	110
MPPA derivative	20	2	95.4	104

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of compounds in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.1.5 添加回収試験

2.1.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 5 のとおり、GLYP について平均回収率は 82.3~115 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 18 %以下，GLUF について平均回収率は 80.9~111 %， RSD_r は 12 %以下，MPPA について平均回収率は 79.1~113 %， RSD_r は 11 %以下，*N*-アセチルグリホサートについて平均回収率は 84.5~110 %， RSD_r は 15 %以下，*N*-アセチルグルホシネートについて平均回収率は 86.0~117 %， RSD_r は 18 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドラインに定められた 1)及び 2)の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 併行精度：22 %以下（添加濃度 0.04 mg/kg 及び 0.05 mg/kg），14 %以下（同 2 mg/kg），10 %以下（同 20 mg/kg）

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 5 Recoveries for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

Targets	Spiked level (mg/kg)	Soybean		Kinako		Soybean meal	
		recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
GLYP	0.04	115	12	85.6	18	95.7	13
	20	109	4.1	82.3	4.1	104	4.6
GLUF	0.05	102	12	102	12	84.8	3.7
	2	111	9.4	80.9	11	111	8.2
MPPA	0.05	107	3.7	94.4	10	79.1	11
	2	111	3.1	90.0	3.7	113	6.0
<i>N</i> -acetylglyphosate	0.04	110	15	89.0	6.9	93.9	11
	20	92.6	4.9	84.5	5.4	104	4.4
<i>N</i> -acetylglufosinate	0.05	92.1	9.0	107	17	86.0	18
	2	111	5.7	88.4	8.1	117	3.3

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

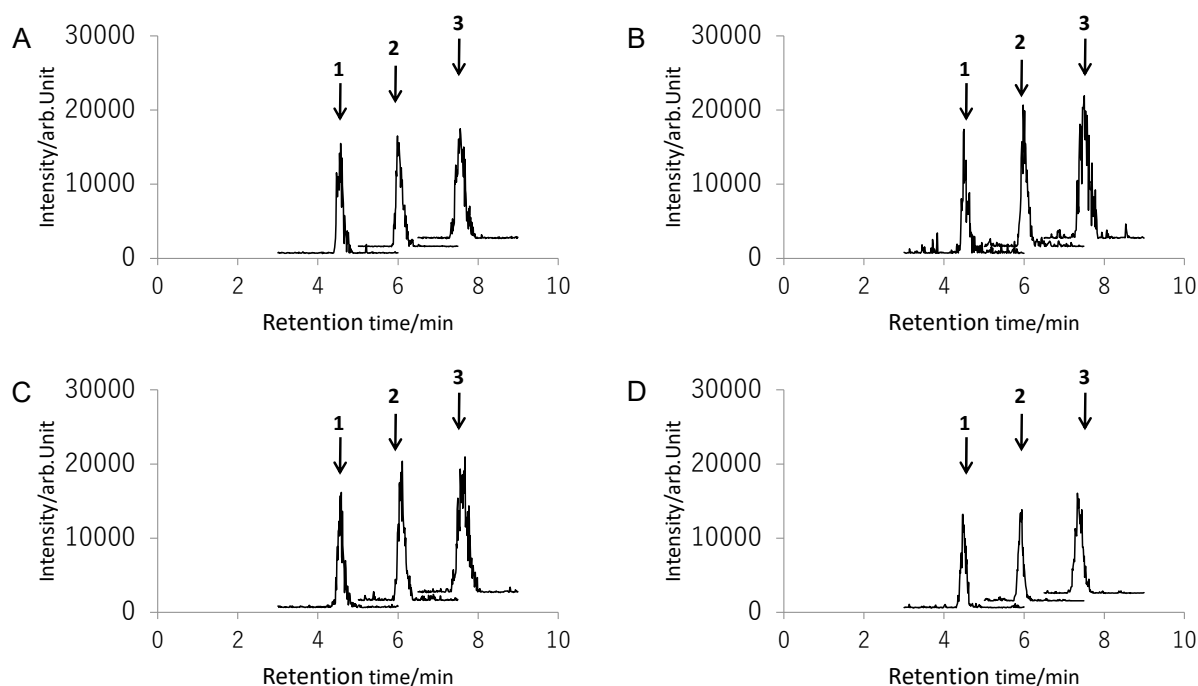


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines were shifted for display.)

- A: Standard solution (The concentration is 0.5 ng/mL as GLYP, GLUF and MPPA.)
- B: Sample solution of soybean spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).
- C: Sample solution of kinako spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).
- D: Sample solution of soybean meal spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).

3.1.6 定量下限及び検出下限

GLYP 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLYP として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（大豆及び大豆油かすに GLYP として 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.4 ng/mL 相当量）及び *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.32 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり（Table 5），得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため、GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートの定量下限は大豆及び大豆油かすで 0.04 mg/kg とした。

GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLUF 及び MPPA として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（大豆及び大豆油かすに GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグリホサートとしてそれぞれ 0.05 mg/kg 相当量（同 GLUF として 0.5 ng/mL 相当量, MPPA とし

て 0.5 ng/mL 相当量, GLUF として 0.37 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果は良好であり (Table 5), 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの定量下限は大豆及び大豆油かすで 0.05 mg/kg とした.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は大豆及び大豆油かすで GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートとして 0.01 mg/kg, GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.02 mg/kg であった.

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため, 2.2 により共同試験を実施した.

GLYP の結果は Table 6 のとおりであり, 平均回収率は 84.9~98.3 %, RSD_r は 8.7~13 %, RSD_R は 14~17 %, HorRat は 0.76~1.6 であった.

GLUF の結果は Table 7 のとおりであり, 平均回収率は 94.3~105 %, RSD_r は 6.8~13 %, RSD_R は 15~23 %, HorRat は 0.77~1.3 であった.

MPPA の結果は Table 8 のとおりであり, 平均回収率は 102~117 %, RSD_r は 6.2~20 %, RSD_R は 16~26 %, HorRat は 1.1~1.6 であった.

それぞれの成分ともに, 妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値 (GLYP の大豆 1 については 41 %以下, 大豆 2 については 21 %以下, きな粉については 25 %以下, 大豆油かす 1 については 32 %以下, 大豆油かす 2 については 22 %以下, 大豆油かす 3 については 20 %以下, GLUF の大豆 1 については 44 %以下, 大豆 2 については 29 %以下, きな粉については 35 %以下, 大豆油かす 1 については 41 %以下, 大豆油かす 2 については 30 %以下, 大豆油かす 3 については 28 %以下, MPPA の大豆 1 については 44 %以下, 大豆 2 については 29 %以下, きな粉については 35 %以下, 大豆油かす 1 については 40 %以下, 大豆油かす 2 については 29 %以下, 大豆油かす 3 については 27 %以下) を満たす良好な結果が得られた. HorRat については, 1.5 を超えるものが散見されたが, 本法は精製工程が長いこと, 水の濃縮乾固後もエバポレーターを使用し続けると回収率が下がること, 一般的に誘導体化の工程を含むとばらつきが大きくなることなどの影響のためと考えられた.

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した.

Table 6 Collaborative study for GLYP

Lab. No.	Soybean 1		Soybean 2		Kinako		Soybean meal 1		Soybean meal 2		Soybean meal 3	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.218	0.210	21.6	20.4	5.86	5.54	1.30	1.32	13.8	14.1	29.1	27.5
2	0.144	0.172	15.2	15.5	3.99	4.84	0.936	0.981	10.5	9.93	20.3	21.0
3	0.162	0.172	17.0	15.2	4.08	4.98	0.929	0.933	10.3	10.8	16.0	20.0
4	0.158	0.161	14.4	14.8	4.38	3.63	0.959	0.739	9.84	10.6	20.2	20.7
5	0.219	0.179	15.8	15.7	4.14	5.05	0.675	1.02	13.0	9.53	22.4	24.9
6	0.161	0.169	18.8	18.9	4.95	4.61	1.06	0.973	12.0	11.2	24.1	24.6
7	0.191	0.202	14.1	16.8	3.67	4.63	0.970	0.877	10.2	9.48	18.5	20.7
8	0.247	0.165	21.1	16.3	5.99	5.21	0.907	1.15	9.49	12.5	18.9	24.6
Spiked level (mg/kg)	0.2		20		5		1		12		24	
No. labs ^{a)}	8		8		8		8		8		8	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.183		17.0		4.72		0.983		11.1		22.1	
Mean recovery (%)	91.6		84.9		94.4		98.3		92.3		92.1	
RSD _r ^{c)} (%)	13		8.7		11		13		11		9.0	
RSD _R ^{d)} (%)	16		15		15		17		14		16	
PRSD _R ^{e)} (%)	21		10		13		16		11		10	
HorRat	0.76		1.4		1.2		1.1		1.3		1.6	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed
b) Number of the removed outliers
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Collaborative study for GLUF

Lab. No.	Soybean 1		Soybean 2		Kinako		Soybean meal 1		Soybean meal 2		Soybean meal 3	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.107	0.102	2.14	2.09	0.620	0.560	0.215	0.236	1.59	1.68	2.85	2.85
2	0.0908	0.104	1.98	1.98	0.458	0.574	0.212	0.226	1.54	1.56	2.80	2.63
3	0.0781	0.0633	1.78	1.56	0.420	0.461	0.203	0.203	1.62	1.50	1.81	2.13
4	0.0889	0.0833	1.60	1.55	0.482	0.465	0.212	0.173	1.34	1.36	2.42	2.32
5	0.129	0.123	2.07	2.05	0.533	0.643	0.188	0.232	1.91	1.66	2.86	2.80
6	0.0751	0.0705	1.54	1.54	0.402	0.396	0.160	0.156	1.20	1.28	2.15	2.11
7	0.116	0.113	2.10	2.45	0.650	0.572	0.247	0.228	2.02	1.64	3.23	3.37
8	0.104	0.0607	2.29	1.57	0.649	0.538	0.140	0.216	1.18	1.59	2.05	2.61
Spiked level (mg/kg)	0.1		2		0.5		0.2		1.5		2.5	
No. labs ^{a)}	8		8		8		8		8		8	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.0943		1.89		0.526		0.203		1.54		2.56	
Mean recovery (%)	94.3		94.7		105		101		103		102	
RSD _r ^{c)} (%)	13		11		11		12		10		6.8	
RSD _R ^{d)} (%)	23		16		17		16		15		18	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		15		18		20		15		14	
HorRat	1.0		1.1		0.97		0.77		1.0		1.3	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed
b) Number of the removed outliers
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 8 Collaborative study for MPPA

Lab. No.	Soybean 1 (mg/kg)		Soybean 2 (mg/kg)		Kinako (mg/kg)		Soybean meal 1 (mg/kg)		Soybean meal 2 (mg/kg)		Soybean meal 3 (mg/kg)	
1	0.161	0.148	2.20	2.18	0.650	0.596	0.265	0.291	2.09	2.06	3.62	3.44
2	0.0870	0.0880	1.92	1.91	0.465	0.541	0.237	0.268	1.92	1.93	3.22	3.16
3	0.0998	0.0908	1.94	1.45	0.413	0.464	0.114	0.124	2.03	1.65	1.79	2.22
4	0.0878	0.0872	1.37	1.49	0.482	0.410	0.190	0.164	1.31	1.38	2.38	2.16
5	0.159	0.138	2.54	2.64	0.720	0.744	0.272	0.254	2.12	2.00	3.28	3.90
6	0.102	0.158	1.97	2.07	0.490	0.474	0.205	0.191	1.51	1.52	2.47	2.49
7	0.124	0.116	2.15	2.04	0.580	0.190	0.232	0.209	1.78	1.68	2.76	2.82
8	0.118	0.0912	2.55	2.15	0.645	0.596	0.165	0.202	1.52	1.65	2.45	2.63
Spiked level (mg/kg)	0.1		2		0.5		0.2		1.5		2.5	
No. labs ^{a)}	8		8		8		8		8		8	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.116		2.04		0.529		0.211		1.76		2.80	
Mean recovery (%)	116		102		106		106		117		112	
RSD _r ^{c)} (%)	15		8.2		20		8.2		6.2		7.4	
RSD _R ^{d)} (%)	25		19		26		26		16		22	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		14		18		20		15		14	
HorRat	1.1		1.3		1.5		1.3		1.1		1.6	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed
b) Number of the removed outliers
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Prominence Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	InertSil C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 µm)
6	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: 4000 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: ExionLC AD, AB SCIEX MS/MS: API-5500 Q TRAP, AB SCIEX	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

大豆及び大豆油かすに残留する GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチ

ルグルホシネートについて、収載法を基に、LC-MS/MS を用いた分析法を開発するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、抽出液の希釈溶媒を変更することで、以下の結果が得られ、収載が可能であると考えられた。

- 1) 大豆，きな粉及び大豆油かすについて，本法に従って得られたクロマトグラムには選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果，GLYP，GLUF，MPPA，*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) 大豆，きな粉及び大豆油かすに GLYP として 0.04 及び 20 mg/kg 相当量，GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量，MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量を添加並びに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.05 及び 2 mg/kg 相当量を添加し，本法に従って 5 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を求めたところ，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートの定量下限は 0.04 mg/kg，検出下限は 0.01 mg/kg，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの定量下限は 0.05 mg/kg，検出下限は 0.01 mg/kg であった。
- 5) 大豆 1 に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量，大豆 2 に GLYP として 20 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 mg/kg 相当量，きな粉に GLYP として 5 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量，大豆油かす 1 に GLYP として 1 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量，大豆油かす 2 に GLYP として 12 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.5 mg/kg 相当量，大豆油かす 3 に GLYP として 24 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいたジーエルサイエンス株式会社，一般財団法人日本食品分析センター一彩都研究所及び一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会：グリホサート農薬評価書，平成 28 年 7 月 (2016)。
- 2) 食品安全委員会：グルホシネート農薬評価書（第 3 版），平成 25 年 7 月 (2013)。
- 3) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953)。
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 5) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。

- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 齊木 雅一，廣井 利明：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～，飼料研究報告，**44**，136-150 (2019).
- 8) 牧野 大作，若宮 洋市，榊原 良成，船木 紀夫：穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法，飼料研究報告，**39**，30-143 (2014).
- 9) 杉本 泰俊，船木 紀夫，榊原 良成：穀類，乾牧草，稲わら及び稲発酵粗飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，**40**，71-90 (2015).
- 10) 齊木 雅一，宮野谷 杏：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料への適用～，飼料研究報告，**45**，93-102 (2020).
- 11) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 12) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 13) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).
- 14) 高橋 邦彦，堀江 正一，青羽 信次：HPLC による農産物中のグリホサート及びその代謝物アミノメチルホスホン酸の分析，*食品衛生学雑誌*，**42**，304-308 (2001).